**Plateforme de Spectrométrie Isotopique de LIENSs**

# Annexe 2 : Préparation des échantillons

*(version 3.8, janvier 2014)*

Cette annexe détaille les procédures techniques de préparation de divers échantillons en vue de leur analyse isotopique, elle ne présente pas les méthodes et stratégies d'échantillonnage qui sont de la responsabilité des chercheurs et dépendent de leurs objectifs ainsi que des sites et des matériels étudiés.
Ses différentes parties traitent de la préparation proprement dite des échantillons, mais aussi de leur mise en capsules et de l'écriture des formulaires d'analyse.

Cette annexe est plus particulièrement écrite en vue d'analyses C & N, sa plus grande part peut s'appliquer aux autres isotopes ou autres matrices sont les spécificités sont ou seront données dans des sous-annexes additionnelles (annexe 2a : soufre ..)

## 1. Traitement des échantillons

La préparation des échantillons dépend en premier lieu de leur type : les échantillons de phytoplancton ou de matière organique particulaire recueillis sur filtres ne se traitent pas comme les sédiments ni comme les organismes. L'analyse des nutriments dissous, ainsi que celle des carbonates, nécessite des techniques particulières qui feront aussi l'objet de paragraphes spécifiques.

### 1.1. Organismes végétaux et animaux

La grande majorité des échantillons traités par la Plateforme de Spectrométrie Isotopique sont des échantillons de ce type : plantes supérieures, phanérogames marines, microalgues, macrofaune, méiofaune, tissus de mammifères ou d'oiseaux, etc…
La chaine de traitement des échantillons depuis leur prélèvement n'est pas très contraignante pour les analyses isotopiques, en comparaison d'autres types d'analyses. La plupart des échantillons peuvent être analysés après simplement séchage et broyage, d'autres nécessiteront des traitements supplémentaires pour éliminer certains constituants indésirables comme les carbonates (beaucoup plus enrichis en $^{13}C$ que la matière organique, ils doivent être enlevés pour des études de réseaux trophiques) ou les lipides (appauvris en $^{13}C$, il est nécessaire, dans certains cas, de retirer les lipides de réserve qui peuvent fausser l'estimation de l'origine de la nourriture).

#### 1.1.1. Prélèvement, prétraitement et conservation des échantillons

Contrairement à ce qui est dit dans certains articles anciens qui préconisent d'utiliser uniquement des flacons en verre, parfois même recommandent un lavage acide, les organismes peuvent être prélevés sur le terrain dans des flacons ou des sacs en matière plastique (en prenant soin cependant d'utiliser des récipients lavés - même s'ils sont neufs -

et ne pas gratter des fioles plastiques avec des instruments métalliques pouvant arracher des particules de plastique).
Les organismes doivent être transportés au frais et les animaux gardés vivants pour être placés au laboratoire dans de l'eau filtrée pour vider leur estomac, le bol alimentaire pouvant interférer avec leur signature isotopique propre. Ceci est particulièrement important pour les animaux ingérant du sédiment.
Les organismes doivent être nettoyés avant congélation de tout débris ou sédiment, les macrophytes doivent éventuellement être placées quelques minutes dans un bain d'HCl 0,1 N pour enlever tout carbonate associé à certains épibiontes, puis rincées à l'eau pure.
Les échantillons peuvent ensuite être conservés congelés à -20°C, ou séchés puis conservés au congélateur ou même dans un dessicateur sous vide à température ambiante.

***Cas particuliers*** *: dans certains lieux d'échantillonnage où aucun équipement n'est disponible pour conserver congelés ou sécher les échantillons, ces derniers peuvent être conservés dans de l'éthanol (pur) à 70%, qu'il faut évaporer ensuite au laboratoire.*
*L'éthanol est le moins mauvais des conservateurs (**ne jamais utiliser de formol !!!**), il faut s'assurer cependant qu'il n'a aucun effet (ou quantifier cet effet) sur le type d'échantillons analysés (pour information, des tests ont montré qu'il n'a aucun effet sur les plantes terrestres, mais qu'il a un léger effet sur la signature de graines. Il est d'autre part souvent utilisé pour conserver les échantillons de sang prélevés sur les oiseaux).*

**Pour les analyses isotopiques, peu de précautions sont nécessaires pour la conservation des échantillons, le point important est qu'il n'y ait pas développement de bactéries ou de champignons.**

### 1.1.2. Séchage des échantillons

Le séchage peut être obtenu de différentes façons : séchage à l'étuve ou par lyophilisation (voire même au soleil pour des missions dans des zones sans électricité : l'important est qu'il n'y ait pas de développement bactérien).
Le séchage en étuve ne devrait pas être fait à une température >50°C (risque de perte de certains lipides volatils). Contrairement à la lyophilisation, le séchage en étuve conduit généralement à l'obtention d'une matière parfois très dure, difficile à broyer ensuite au mortier.

*Les échantillons très gras (lard de mammifères marins par exemple) ne peuvent généralement pas être ni séchés ni lyophilisés correctement. Sauf si on les broie ensuite sous azote liquide, il est préférable de faire une délipidation préliminaire en les découpant en petits morceaux avec des ciseaux avant de les sécher (de préférence par lyophilisation).*

D'autre part, le broyage à l'aide d'un broyeur à billes (cf ci dessous) exige des échantillons extrêmement secs. Il est préférable dans ce cas de placer les échantillons pendant une nuit dans un dessicateur sur $P_20_5$ et sous vide avant de broyer.

### 1.1.3. Broyage des échantillons

Le broyage pour les analyses isotopiques doit permettre d'obtenir une poudre très fine (comme de la farine) et homogène, ce qui permet de garantir i) une bonne combustion et ii) une bonne représentativité de l'échantillon. Cependant, si l'échantillon est considéré comme homogène (sang, muscle d'invertébré), un broyage approfondi est moins nécessaire. Les

tout petits organismes peuvent aussi être analysés *in toto*, si leur masse ne dépasse pas la limite haute.
Il existe de très nombreux systèmes de broyage. Pour les analyses isotopiques, le vibro-broyeur à billes est particulièrement efficace, il permet d'obtenir rapidement des poudres très fines. Il faut cependant que les échantillons soient très secs ou l'utiliser sous azote liquide.

Le broyeur utilisé est un vibro-broyeur Retsch MM400 (Haan, Allemagne).
Divers bols de broyage sont disponibles : 10 ml en inox (1 ou 2 billes de 9 ou 10 mm) , 25 ml en inox (1 ou 2 billes de 12 mm), 35 ml en zirconium (1 bille de 12 mm), ainsi que des supports pour 20 microtubes 2 ml (1 bille de 3 mm + 1 bille de 4 mm).

*Les bols en zirconium sont réservés pour le broyage pour des analyses de lipides ou de métaux.*
*Le broyage en microtubes est utile pour les échantillons de petite taille (dont le volume n'excède pas 1/3 du volume du microtube) : même si le temps de broyage est plus long (3 minutes contre 1 généralement en bols inox), 20 échantillons peuvent être broyés simultanément et les échantillons conservés dans le tube, ce qui évite d'avoir à laver et sécher les bols (Attention cependant à ne pas broyer dans ces tubes des échantillons trop durs, qui pourraient arracher des particules de plastique, par ex des bouts de coquilles).*

L'utilisation du broyeur est très simple mais doit respecter les points suivants :

- ne jamais l'utiliser avec un seul bol installé : même s'il n'y a qu'un échantillon à broyer, le deuxième bol de même taille (avec les billes correspondantes) doit être mis en place.
- ne pas utiliser des billes d'un matériau différent de celui du bol.
- charger les deux bols avec approximativement la même masse.
- la quantité d'échantillon ne doit pas être <25% du volume du bol
- **ne jamais serrer fortement le dispositif de serrage** : le système d'encliquetage est largement suffisant pour maintenir les bols.

Le manuel complet du broyeur ainsi que la fiche-résumé de sa mise en œuvre (décrite aussi en fin de cette annexe : Fiche Retsch MM400, page 13) sont disponibles sur un présentoir fixé sur le mur juste au-dessus de l'appareil.

***Il est absolument impératif de lire cette fiche avant d'utiliser le broyeur pour la 1ère fois.***

### 1.1.4. Délipidation des échantillons

La délipidation des échantillons de consommateurs est nécessaire dans les études de réseaux trophiques quand leur contenu en lipides est important et quand il varie beaucoup au cours de l'année (ex : constitution de réserves pour la reproduction). En effet les lipides sont beaucoup plus pauvres en $^{13}C$ que les autres constituants biochimiques, ils affectent donc la signature totale sans qu'il y ait changement de ressources trophiques. Cependant **si l'organisme étudié est une proie de teneur en lipides peu variable, sa délipidation est moins justifiée**, les lipides (et le carbone qu'ils contiennent) participant aux ressources trophiques du prédateur.

Dans tous les cas, seuls les lipides de réserve devraient être retirés, étant ceux qui sont susceptibles de varier beaucoup. La méthode de délipidation utilisée (cyclohexane à froid) a

cet avantage, elle atténue en effet les inconvénients observés avec les méthodes généralement utilisées, basées sur des mélanges chloroforme-méthanol, qui ont souvent un effet secondaire sur les rapports isotopiques de l'azote. Ces méthodes extraient en effet aussi d'autres molécules en particulier aminées.

**Attention : même si le cyclohexane a moins d'effet que les méthodes chloroforme-méthanol, il peut y avoir un effet plus prononcé sur certains tissus (glandes digestives).**
**Faire des tests pour vérifier cet effet, et dans certains cas il peut être préférable de faire 2 analyses, une avec délipidation (C), l'autre sans délipidation (N).**

Dans le cas où il faut effectuer à la fois une délipidation et une décarbonatation, il vaut mieux commencer par la délipidation en particulier quand la teneur en lipides est importante.

**Protocole de délipidation**

1 - Environ 80 à 100 mg d'échantillons broyés sont placés dans des tube de verre de 10 ml à bouchon à vis avec joint Téflon® ( 2 x 20 échantillons peuvent être préparés en même temps)

2 - Ajouter 4 ml de cyclohexane p.a. (distributeur automatique), boucher soigneusement, agiter avec un vortex et placer éventuellement pendant 1 minute dans un bain à ultrasons (attention à l'échauffement)

3 - Placer les tubes sur un agitateur rotatif pendant 1 h

4 - Centrifuger à 2500 t/min (1200 g) pendant 10 min à 10°C

5 - Noter la couleur des surnageants et les évacuer avec précaution dans le flacon "Poubelle Cyclohexane"

6 - Si le surnageant est coloré*, refaire l'extraction à partir de l'étape 2

7 - Rincer le culot en ajoutant 2 ml de cyclohexane, boucher le tube, agiter au vortex (éventuellement placer pendant 1 min dans un bain à ultrasons : attention à l'échauffement)

8 - Centrifuger à nouveau (1200 g, 10 min, 10°C), évacuer le surnageant dans la poubelle à cyclohexane

9 - Sécher les culots en plaçant les tubes dans un bain à sec réglé sur maximum 45°C. Le séchage est rapide (≈ 2 h)

10 - Récupérer les échantillons dans des tubes 2 ml à bouchons à joint torique.

11 - Laver et sécher les tubes

* Attention : il peut arriver que les surnageants ne soient pas colorés malgré une forte teneur en lipides (certains poissons)

### 1.1.5. Décarbonatation des échantillons

Ce traitement est nécessaire lorsque l'on réalise des analyses isotopiques sur de la matière organique, dès qu'il y a un risque d'avoir dans les échantillons des carbonates (minéraux). Leur contenu en $^{13}C$ toujours très élevé peut fausser les résultats, même si la teneur en carbone inorganique est faible.
Il est ainsi préférable de décarbonater les muscles de poissons, qui peuvent contenir des arêtes parfois peu visibles, certains crustacés et certains invertébrés. Les macrophytes peuvent aussi avoir des épibiontes calcaires fixés.

Sur organismes frais :

La décarbonatation peut être faite sur les organismes frais si la pénétration de l'acide jusqu'aux carbonates est assurée (cas des macrophytes, voir § 1.1.1) : dans ce cas immerger les échantillons dans HCl 0.1 N et observer la formation de bulles ; quand celle-ci cesse, rincer soigneusement par de l'eau pure.

Sur organismes séchés :

**Protocole de décarbonatation (organismes secs broyés)**

- placer environ 100 mg maximum d'échantillon broyé dans une fiole à décarbonatation en verre (fiole 8 ml fond plat, ou tube 8 ml)
- ajouter 1 ml HCl 0.1 N (ou 0.5 N si les échantillons sont susceptibles de contenir beaucoup de carbonates)
- placer dans un bain à ultrasons pendant 1 min
- observer la formation de bulles : lorsque celle-ci cesse, ajouter 100 µl d'HCl pour vérifier que tous les carbonates ont été transformés
- placer les fioles **dans le bain à sec Techne** à 60°C
- mettre en place le système d'évaporation par flux d'air filtré en prenant soin à ce que tous les tubes plongeurs soient bien introduits dans les fioles d'environ 1 cm. Ouvrir l'air comprimé et vérifier ½ heure après que le flux n'a pas diminué
- laisser sécher (plusieurs heures, laisser de préférence une nuit)
- reprendre par 1 ml d'eau pure, homogénéiser (par ex : 1 minute dans un bain à ultrasons)
- congeler les fioles (éviter de le faire à -80°, ces fioles sont fragiles) et les lyophiliser
- avec une spatule, écraser la poudre et gratter les parois pour tout récupérer
- transférer les échantillons dans un tube plastique 2 ml à capuchon vissant
- laver et sécher les fioles

**<u>Attention</u> : la décarbonatation peut avoir un effet aussi sur la signature isotopique de l'azote, qui est normalement non significatif sur les tissus animaux ou végétaux peu carbonatés (cet effet est surtout observé quand il y a ensuite lavage de l'échantillon pour enlever l'acide). Il peut cependant être plus important sur certains échantillons biologiques et les sédiments très carbonatés pour lesquels il faut utiliser de l'acide plus concentré.**
**Faire des tests pour vérifier cet effet, et dans certains cas il peut être préférable de faire 2 analyses, une avec décarbonatation (C), l'autre sans décarbonatation (N).**

## 1.2. Sédiments

### 1.2.1. Prélèvement, prétraitement et conservation des échantillons

Les échantillons de sédiment sont le plus souvent prélevés par carottage. Si les analyses doivent être faites sur différents niveaux sédimentaires, ceux-ci doivent être découpés immédiatement sur le terrain (selon leur volume, il sont alors placés soit dans des sacs plastique, soit dans des flacons, soit dans des boîtes de Petri).
Les échantillons doivent être conservés au frais (et à l'abri de la lumière si la chlorophylle doit aussi être mesurée).
Les échantillons sont ensuite séchés par lyophilisation, réduits en poudre grossière au mortier / pilon et tamisés sur 250 µm pour enlever les très grosses particules.

*Le séchage en étuve est possible mais peut conduire (cas de la vase) à l'obtention d'une structure très dure difficile à broyer sur laquelle il est très difficile de réaliser le tamisage préalable nécessaire.*

Les échantillons sont ensuite broyés finement (cf. § 1.1.3) et conservés au sec à température ambiante ou au congélateur.

### 1.2.2. Décarbonatation

Les sédiments contiennent des quantités très variables de carbonates et la force de l'acide devra être ajustée en conséquence en faisant des tests : placer 100 mg de sédiment sec dans un tube, ajouter 1 ml d'HCL 1 N. Si la formation de bulles n'est pas importante, la force de l'acide peut être réduite (0.5 N), si elle est très importante, utiliser de l'HCL 2 N.
Suivre ensuite la procédure standard (cf § 1.1.5).

**Attention** : La plupart des sédiments littoraux contiennent des quantités non négligeables de carbonates, il faut donc des quantités d'acide importantes pour les décarbonater. Il se forme alors beaucoup de $CaCl_2$, avec 3 conséquences non négligeables :
- le $CaCl_2$ lors de la combustion des échantillons peut se transformer en divers produits chlorés, qui dégradent rapidement les produits de la colonne de combustion et attaquent même le quartz de la colonne jusqu'à la rendre poreuse voire aller jusqu'à une cassure.
- le poids du $CaCl_2$ formé est supérieur au poids des carbonates décomposés : le changement de poids des échantillons doit être pris en compte si la teneur en carbone (%C) doit être mesurée.
- le $CaCl_2$ est un produit très hygroscopique : les échantillons doivent être conservés au dessicateur et leur pesée lors de leur mise en capsules doit se faire rapidement.

***<u>Note</u> : Les sédiments acidifiés, même après évaporation de l'acide, restent cependant très acides et attaquent assez rapidement les capsules d'étain. Pour éviter cela, on peut analyser les échantillons très rapidement (8-10 j) après leur mise en capsules ou utiliser des***

***capsules en argent mais dans ce cas il faut placer les boulettes réalisées dans une 2ème capsule en étain qui facilitera la combustion.***
***En attendant les échantillons doivent être conservés dans un dessicateur sur $P_2O_5$ sous vide.***

***<u>Rappel</u> : la décarbonatation peut avoir un effet sur la signature de l'azote. Cet effet doit être estimé sur les échantillons traités, en fonction de l'acide utilisé. Il pourra être préférable de faire 2 analyses, une avec décarbonatation (C), l'autre sans décarbonatation (N).***

## 1.3. Phytoplancton et MOP (Matière Organique Particulaire) sur filtres

### 1.3.1. Prélèvement, prétraitement et conservation des échantillons

Le phytoplancton et la MOP sont récoltés sur filtres en fibre de verre (type GF/C ou GF/F) ou sur filtres en fibre de quartz, matériaux qui n'amènent pas de carbone, d'azote ou de soufre lors de l'analyse elle-même.
Les filtres en fibre de verre ont le désavantage, par rapport au quartz, de fondre lors de la combustion avec parfois constitution d'un bloc dans l'insert, difficile à enlever. Cela nécessite donc d'enlever plus fréquemment les cendres. Cependant les filtres en quartz sont beaucoup plus difficiles à manipuler au moment de la filtration.
Dans tous les cas, les filtres doivent être nettoyés par combustion à 450°C max pendant 3 h (certains nettoient aussi préalablement par HCl 0,1 N et rinçage soigneux à l'eau pure).

Le volume filtré est fortement dépendant de la taille et l'abondance des particules en suspension ainsi que de la taille du filtre. Le volume filtré doit être noté si la quantité absolue de C et/ou N doit être connue. Dans ce cas il est aussi important de considérer les points concernant la mise en boulettes des échantillons (§ 2.5 et 2.6).
Après filtration les filtres sont placés individuellement dans des récipients propres (boîtes de Petri, flacons verre) et conservés au frais, à l'abri de la lumière, puis stockés au laboratoire au congélateur -20° avant les traitement ultérieurs.

### 1.3.2. Décarbonatation

Cette étape est nécessaire pour enlever les carbonates de l'eau de mer encore présente sur le filtre ou des organismes ou particules calcaires filtrés.
Les filtres peuvent être décarbonatés directement, ou lyophilisés mais dans ce cas, il est préférable de les humidifier pour faciliter l'acidification..
Celle-ci est réalisée par exposition à des vapeurs d'HCl, en plaçant (sous hotte) les récipients contenant les filtres (contenants ouverts) dans un dessicateur en verre, avec un bécher contenant une dizaine de ml d'HCl fumant (37%), sous vide léger, pendant 4 h.

***Attention : Ne pas manipuler l'acide fumant sans blouse ni gants et en dehors de la hotte.***

Après avoir enlevé le bécher avec l'acide, le dessicateur contenant les filtres est laissé ouvert au minimum une nuit sous la hotte.
Les échantillons sont ensuite conservés soit au congélateur, soit dans un dessicateur sous vide, sur dessicant pour les sécher s'ils n'étaient pas secs.

# 2. Mise en capsule des échantillons

## 2.1. Poids des échantillons

Même si la configuration du spectromètre de masse utilisé permet d'analyser des échantillons dans une large gamme de poids avec la même précision, il est préférable d'essayer de rester dans la gamme "optimale". En-dessous des valeurs minimales, les valeurs obtenues ne sont pas fiables. Au-dessus des valeurs maximales, il peut y avoir saturation des détecteurs

Le tableau ci-dessous indique les poids minimum, maximum et optimaux pour chaque type d'échantillon (en mg PS) pour des analyses C et N. Pour les sédiments, des tests sur quelques échantillons doivent être faits pour déterminer le poids optimal. Pour les filtres, le poids n'est pas utile, il est impossible de connaître le poids de fibre de verre par rapport à la matière organique : on se réfère plutôt dans ce cas au volume filtré (cf § 1.3.1)

| Type d'échantillon | Minimum | Optimal | Maximum |
|---|---|---|---|
| Tissu animal | 0,1 mg | 0,4 mg | 1,5 mg |
| Micro ou macroalgues | 0,2 mg | 0,6 mg | 1,8 mg |
| Phanérogames marines | 0,3 mg | 0,7 mg | 2,0 mg |
| Angiospermes | 0,3 mg | 0,7 mg | 2,0 mg |
| Sédiment riche en matière organique | 0,2 mg | 0,6 mg | 1,8 mg |
| Sédiment pauvre (sable) | 1,0 mg | - | > 30,0 mg |

## 2.2. Choix des capsules

Pour les échantillons d'animaux ou de plantes, les quantités d'échantillons sont très petites , des capsules de 8 x 5 mm conviennent parfaitement (**ne pas utiliser de capsules plus petites, pour des raisons de combustion et de taille optimale pour le passeur**). Pour les sédiments et les filtres on utilise aussi les mêmes capsules mais il peut être nécessaire d'en utiliser de plus grandes.

Les capsules d'étain peuvent être attaquées par les sédiments acidifiés (en particulier n'ayant pas été gardés à l'abri de l'humidité) dans un délai assez rapide. Si l'analyse ne peut être faite dans un délai court après la pesée, il est préférable d'utiliser des capsules en argent.

## 2.3. Préparation des pesées : précautions nécessaires

La mise en capsules et la pesée des échantillons est l'étape qui requiert le plus de soin dans sa réalisation : toute contamination même par la plus petite particule ou fibre pourrait entrainer un fort risque de mauvais résultat.

- il est donc impératif de porter une blouse (en coton) à ce stade : cela permet d'éviter en grande partie la dissémination des fibres des vêtements (surtout des pull-overs) et l'électricité statique,
- il ne faut utiliser que du papier d'essuyage de donnant pas de fibres (Kimwipes) et des gants sans poudre,

- tous les instruments (pinces, spatules) doivent d'abord être nettoyés à l'alcool, ainsi que la plaque d'aluminium où sont posées les capsules,
- **ne jamais toucher avec les doigts** les capsules ou les parties d'instruments en contact avec les capsules ou la plaque sur laquelle sont manipulées les capsules. Utiliser des gants ou ne travailler qu'avec les pinces.

## 2.4. Pesée

Le manuel d'utilisation de la microbalance se trouve dans un présentoir fixé sur le mur au niveau de cette dernière.

***Avant de peser les échantillons, se munir d'un formulaire de demande d'analyse et lire les instructions pour le remplir correctement (§ 3).***

L'utilisation de la balance en routine se résume à quelques points :

- Ouvrir la balance : appuyer sur un des deux grands boutons situés de chaque côté du clavier, la porte coulissante circulaire s'ouvre sur la droite (pour les gauchers, elle peut s'ouvrir à gauche, cf le manuel),
- Placer le petit support en plastique sur le plateau, puis à l'aide de la pince à bouts fins recourbés, mettre dans le support une capsule vide,
- Fermer la porte en pressant un des grands boutons,
- Attendre que la balance se stabilise (affichage de "mg" après le chiffre) et presser le bouton "Tare",
- Ouvrir la porte, retirer la capsule (ne JAMAIS mettre les échantillons dans la capsule directement dans la balance), la poser dans la partie inférieure droite de la plaque d'aluminium (partie d'environ 6 x 6 cm). Cette zone doit rester ultra-propre, il ne faut jamais la toucher avec la main ou le poignet, ni y poser la spatule,
- Avec une microspatule en forme de cuillère, prélever l'échantillon et le faire tomber dans la capsule en veillant à ce qu'il tombe au fond et non sur les parois,
- Remettre la capsule dans le portoir sur le plateau de la balance, regarder le poids affiché (uniquement 2 décimales avec la porte ouverte, mais cela permet de juger s'il faut rajouter ou enlever de l'échantillon),
- Fermer la porte et attendre la stabilisation,
- Noter le poids affiché dans le formulaire d'analyse (§ 3).

***Note 1*** *: Il est plus difficile d'enlever une partie d'échantillon de la capsule qu'en ajouter.*
***Note 2*** *: Si les échantillons sont électrostatiques, brancher l'ionisateur : il suffit de passer les échantillons pendant une dizaine de secondes dans le faisceau d'ions pour supprimer l'électricité statique.*

## 2.5. Fermeture des capsules

La capsule étant posée verticale dans la zone de travail de la plaque d'aluminium, pincer son bord supérieur sur 1 à 1,5 mm avec une pince à bouts plats (Fig . 1 A) puis replier vers le bas cette partie (Fig. 1 B). Replier ensuite la partie pliée dans l'autre sens (Fig. 1 C), et presser la capsule avec les deux pinces plates (une servant à maintenir la capsule sur la plaque) jusqu'à obtenir une boulette en forme de section de cylindre d'au maximum 3 mm de diamètre et d'environ 1,5 à 2 mm de hauteur (pour les échantillons animaux ou végétaux).

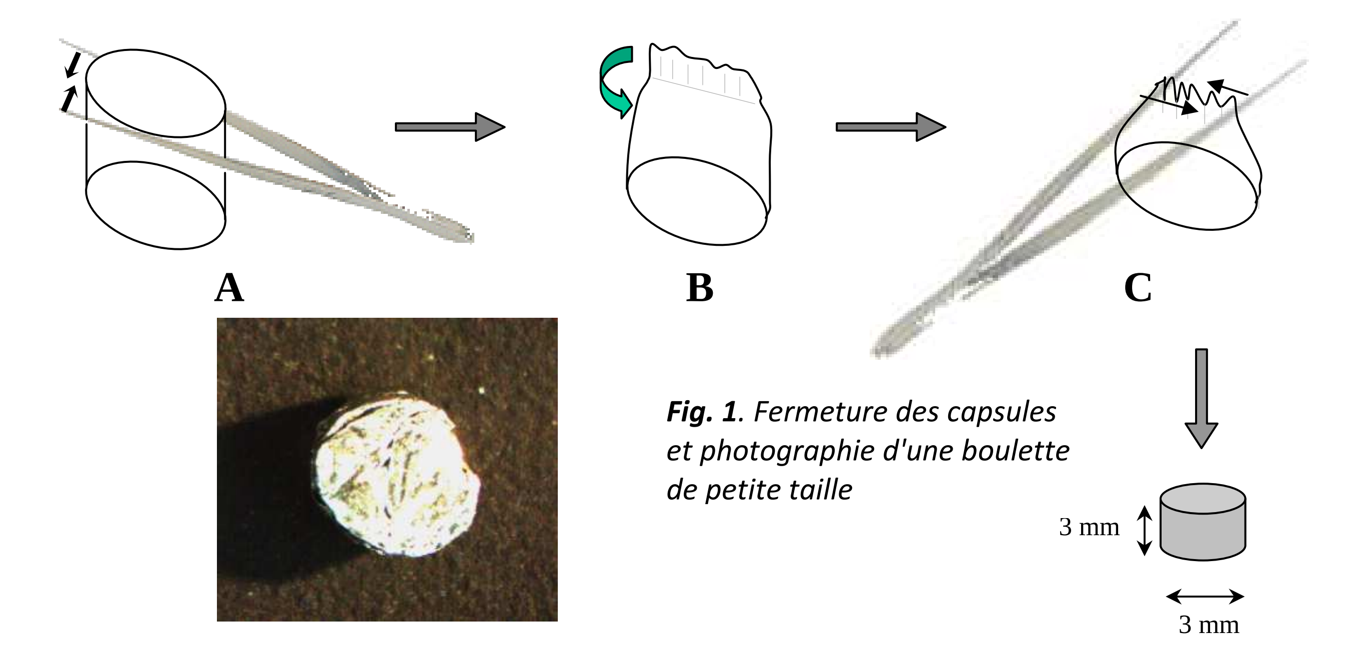



***Fig. 1****. Fermeture des capsules et photographie d'une boulette de petite taille*

Pour les sédiments et les filtres, des capsules de cette taille sont généralement difficiles à faire, le volume des échantillons étant plus important. Dans ce cas, les boulettes sont plutôt sphériques, elles ne doivent cependant pas dépasser 7 mm de diamètre.

***Note*** ***: Il est préférable de faire de petites boulettes si cela est possible, cela permet d'utiliser un plateau de 100 positions au lieu de 50 et ainsi de réaliser au moins 30% d'analyses supplémentaires par jour.***
**Attention** : Ne pas faire de boulettes trop petites (de diamètre <1,5 mm) qui peuvent rester coincées dans le passeur

***Note*** ***: il est important de respecter les consignes concernant la forme et la taille des boulettes. Des boulettes mal faites (cf . fig 2a) peuvent soit se rouvrir (perte d'échantillon et contamination des autres), soit se coincer dans le puits du passeur et ne pas être analysées, soit même bloquer le passeur, avec dans des cas extrêmes perte de tous les échantillons du plateau***.

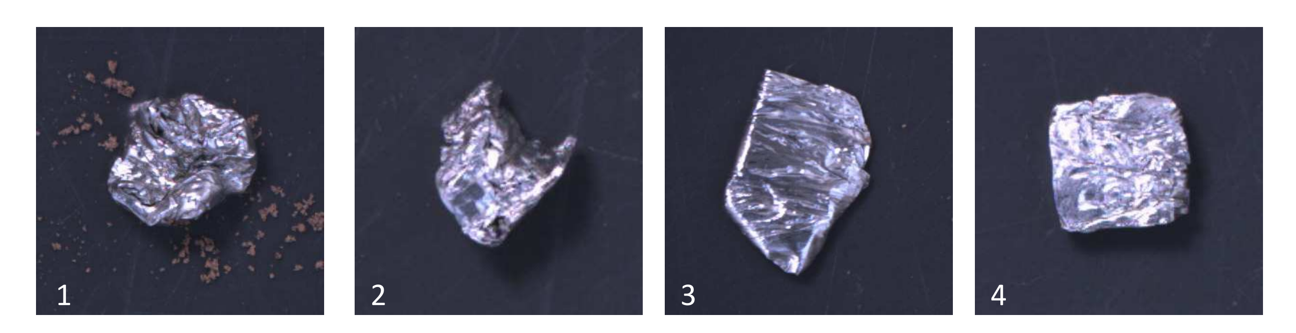



***Fig. 2a****. Exemples de boulettes mal formées : 1) Mal fermée : perte d'échantillon ; 2) Avec des protubérances : risque de rester coincée ; 3) Plate : risque de bloquer l'avancement du plateau ; 4) Carrée : risque de rester coincée dans le puits du passeur*



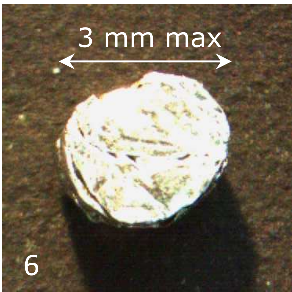







***Fig. 2b**. Exemples de boulettes bien formées : 5-6-7) Petites boulettes (tissus animaux et végétaux) ; 7) Grosse boulette (sédiments et filtres)*

## 2.6. Cas des échantillons sur filtres

La taille des puits des plateaux disponibles sur l'analyseur élémentaire ne permet pas de faire des boulettes contenant un filtre de 25 mm (a fortiori de 47 mm) dans une capsule en étain, et donc de pouvoir l'analyser en entier, plusieurs méthodes sont utilisées :
- grattage et récupération de la matière organique des filtres : dans tous les cas, la récupération ne peut être quantitative, et avec la matière organique, une fraction non négligeable de fibre de verre est prise avec l'échantillon. Il est important de minimiser cette fraction, qui est gênante pour la combustion et augmente la quantité de cendres. Ce type de récupération pose aussi le problème de l'hétérogénéité de la répartition de la matière sur les filtres (voir ci-dessous)
- découpage de fraction de filtres : des aliquotes de filtre peuvent être découpées avec un emporte-pièce, ce qui permet par un rapport de surface d'estimer la quantité totale sur le filtre. Cependant, la répartition de la matière organique est rarement homogène, et à la fois pour l'aspect quantitatif que pour les rapports isotopiques, ce type de traitement peut amener une certaine variabilité.
- utilisation de mini-filtres : la filtration peut être réalisée sur des filtres de 12 mm de diamètre (à découper soi-même dans des filtres plus grands), la filtration étant faite grâce à des supports de filtres de 13 mm (Sweenex par exemple). Après découpage de la partie extérieure non filtrante (qui se découpe bien, simplement par serrage fort du Sweenex sur le filtre encore humide en fin de filtration), et traitement (cf § 1.3), détacher autant que faire se peut la face verso du filtre, exempte de matière organique. Tout le reste tient facilement dans une petite capsule. Cette méthode permet d'obtenir une valeur correspondant à l'ensemble du volume filtré, il est nécessaire cependant d'avoir une charge minimale dans l'eau, la surface de filtration étant réduite.

## 2.7. Rangement, conservation et transport des échantillons

### 2.7.1. Rangement

Les capsules sont rangées dans des plaques 96 puits (Fig. 3), identifiés en lignes (A à H) et colonnes (1 à 12). Les formulaires d'analyse (feuilles Excel) correspondent à ce rangement (cf. § 3).

- **Grouper en séries les échantillons animaux/végétaux et sédiments/filtres (petites et grosses capsules) : 1 grosse boulette parmi les petites oblige à utiliser le plateau à gros puits et diminue la capacité d'analyse**
- **Ne pas laisser de puits vide entre les séries !!**

Le couvercle des plaques de capsules doivent être maintenus par du **ruban adhésif de laboratoire, repositionnable**. Il est en effet nécessaire d'ouvrir plusieurs fois les plaques pour y placer ou en enlever les capsules, cela doit pouvoir être fait facilement.

- ***Ne pas utiliser de ruban adhésif de bureau pour fixer les couvercles ! : fort risque d'ouverture brutale et de mélange ou renversement des capsules (sans compter les traces de colle)***

Chaque plaque doit être marquée (**sur un morceau de ruban adhésif de laboratoire sur le couvercle**) de façon à permettre l'identification du demandeur et de la série d'échantillons (Fig 3).

- ***Ne pas écrire directement sur les boîtes ! les boîtes sont réutilisées après lavage***

**<u>Important</u> : Il est très fortement recommandé d'identifier les boîtes en utilisant un nom identique ou très proche du nom du fichier informatique correspondant (cf. § 3).**



***Fig.3**. Boîte de rangement des capsules*

### 2.7.2. Conservation

Exceptées les capsules d'échantillons de sédiments acidifiés, qu'il faut analyser rapidement, les capsules des autres échantillons peuvent être conservées pendant de longues périodes, de préférence au dessicateur sous vide et au sec plutôt qu'au congélateur où il y a reprise d'eau.

### 2.7.3. Transport

Pour éviter que les capsules, surtout les plus petites, sortent de leur puits et se mélangent pendant le transport (en particulier si les plaques sont envoyées par la poste), placer **une feuille d'aluminium en double ou triple épaisseur sur l'ouverture des puits*** avant de refermer le couvercle. Deux morceaux de ruban adhésif **de laboratoire** suffisent à maintenir le couvercle, mais pour plus de sécurité, entourer la plaque dans une feuille d'aluminium (éviter le parafilm).

**** Ne pas utiliser ni papier type papier filtre ou essuie-tout pouvant amener des fibres, ni parafilm qui peut laisser des traces de carbone type pétrole.***

Les plaques peuvent être envoyées par la poste, en étant protégées des chocs (boite ou enveloppe matelassée suffisamment épaisse).

## 3. Formulaire de demande d'analyses

Les échantillons doivent être référencés dans un formulaire de demande d'analyses (Classeur Excel) qui doit obligatoirement être adressé par courriel aux responsables de la plateforme.

Une procédure légèrement modifiée a été mise en place :

- Chaque plaque d'échantillons doit être accompagnée d'un formulaire distinct (une seule feuille par fichier), la nouvelle version du formulaire a été simplifiée en conséquence, elle ne permet plus la génération automatique de feuilles pour des plaques supplémentaires,
- Une copie numérique de ce formulaire doit être adressée à l'adresse : irms-lienss@univ-lr.fr, mais une copie papier signée du responsable du crédit et valant acte d'engagement doit être fournie. Le nombre d'échantillon de chaque type doit être noté, le calcul du coût sera fait automatiquement.

Une case à cocher permet d'indiquer si les échantillons sont irremplaçables : des précautions plus particulières seront prises pour éviter au maximum les incidents analytiques ou logiciels. Cependant, aucune garantie ne peut être donnée, des incidents étant toujours possibles (coupure de courant, blocage d'une boulette dans le passeur etc…)

Les formulaires doivent être remplis en suivant les recommandations ci-dessous :

- Chaque plaque doit avoir une référence indiquée sur la boîte et en haut de la 2ème feuille du formulaire d'analyse (cf. Fig. 4) et doit permettre une identification certaine (par ex. : ne pas utiliser Box 1, Box 2 ou Boite 1, Boite 2..).
- 

Demandeur : P Richard — Programme : FoodWeBio — Réf. Boîte : FWB 4

Préparé par : P Richard — Date : 14/01/09 — Impression

| Puits n° | Référence Echantillon | Poids (mg) | Type | Remarque |
|---|---|---|---|---|
| A 1 | FWB-LR-M4 | 0.346 | muscle | |
| A 2 | FWB-LR-M5 | 0.309 | - | |
| A 3 | FWB-LA-M1 | 0.441 | - | |
| A 4 | FWB-LA-M2 | 0.288 | - | |

Fig. 4. Formulaire d'analyse (2ème feuille du classeur)

- La référence des échantillons ne doit pas comporter de caractères tels que : . , / ; ( ) ? : (les espaces et tirets sont autorisés). Cette référence étant utilisée par le logiciel comme nom du dossier où sont rangés les fichiers correspondant à l'échantillon. Il est préférable également de ne pas utiliser de lettres accentuées, non reconnues.
- Ne pas avoir comme référence un seul chiffre ou lettre, les fichiers créés ne sont pas reconnus par le logiciel de l'IRMS (bug).

- Chaque échantillon doit avoir une référence unique (même s'il s'agit de capsules faites à partir du même échantillon) et il est fortement recommandé d'utiliser des références caractéristiques qui ont peu de chances d'être aussi employées par un autre utilisateur (ne pas utiliser par ex les n° de référence des puits A1, A2 etc.. ou Ech 1, Ech 2…
- Sauvegarder le fichier Excel **en le renommant** avec le même nom que la référence de la boîte.

## 4. Cas des échantillons enrichis

Les isotopes stables peuvent utilisés pour des expérimentations basées sur des enrichissements à partir de produits contenant >95% d'un élément enrichi.

ⓘ **De très grandes précautions doivent être prises à toutes les étapes de la préparation d'échantillons enrichis : la moindre contamination a un effet désastreux sur les mesures en abondance naturelle.**

**En particulier, il est demandé aux utilisateurs d'être très vigilants sur les points suivants :**

- le taux d'enrichissement ne doit pas dépasser **3%** comme c'est le cas des algues ou proies marquées dans les expériences de grazing. Leur analyse doit se faire en les "diluant" par le même échantillon non marqué : au moment de la pesée dans la capsule, introduire une toute petite quantité d'échantillon marqué (1/20 ou 1/10ème de la masse totale) que devra contenir la capsule, noter le poids, puis rajouter une quantité du même échantillon non marqué - dont la signature naturelle devra être mesurée à part -, noter le poids total et fermer la capsule.
Dans le calcul des enrichissements (on ne travaille pas directement sur les données exprimées en $\delta$ mais sur les abondances absolues), il suffit ensuite de tenir compte du facteur de dilution donné par le rapport des masses de chaque type enrichi et non enrichi.

*On peut aussi diluer par un autre produit que le même échantillon non enrichi, mais dans ce cas il faut tenir compte aussi de la teneur en élément (C ou N) de chaque constituant du mélange.*

***Il est du ressort des utilisateurs de s'assurer qu'ils ne dépassent pas ce taux : au-delà de 3% d'enrichissement, il y a contamination irrémédiable des réacteurs (parfois même de la colonne CPG), dont le remplacement pourra être facturé.***

Entre 1% et 3% d'enrichissement il peut y avoir un "effet mémoire" sur les échantillons suivants, les utilisateurs doivent donc prévoir, autant que faire se peut, leurs séries d'analyse pour aller d'échantillons peu enrichis aux échantillons très enrichis et prévoir éventuellement des blancs supplémentaires entre échantillons.

- Les échantillons doivent être rangés par ordre d'enrichissement (supposé) croissant dans les boîtes 96 puits

- Tous les équipements et petits matériels utilisés pour la préparation des échantillons enrichis doivent être utilisés en prenant garde aux contaminatons possibles. Ils doivent en outre être très soigneusement nettoyés après.

- Une attention particulière doit être portée à l'utilisation de la microbalance : celle-ci servant aussi à peser les standards en abondance naturelle, sa contamination (ainsi que celle des outils associés) pourrait engendrer de mauvais résultats sur tous les échantillons y compris ceux d'autres utilisateurs.

- **Il est impératif d'indiquer sur les boites et dans les formulaires d'analyse qu'il s'agit d'échantillons enrichis.**

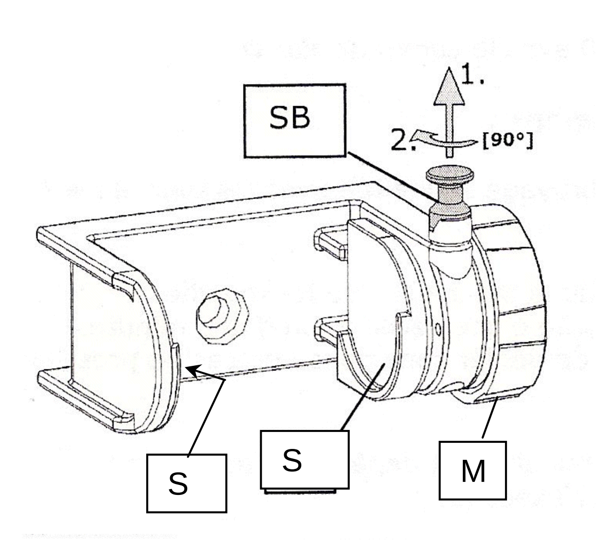
## Fiche d'utilisation du vibro-broyeur Retsch MM400

(Manuel détaillé dans un présentoir derrière l'appareil)

- Choisir les bols à utiliser en fonction de la taille des échantillons : 2 bols équivalents doivent toujours être mis en place (les petits échantillons peuvent être broyés dans des microtubes de 2 ml : mettre un support de chaque côté du broyeur, avec le même nombre de tubes, minimum 4)
- Placer les échantillons et les billes correspondantes dans les bols :

| Type de bol / volume | Billes par bol ou microtube | Usage |
|---|---|---|
| Inox 10 ml | 1 ou 2 billes inox 9 ou 10 mm | Général |
| Inox 25 ml | 1 ou 2 billes inox de 12 mm | Général |
| Zirconium 35 ml | 1 bille zirconium de 12 mm | Lipides ou métaux |
| Microtubes PE 2 ml (x10) | 2 billes inox (3 mm + 4 mm) | Petits échantillons |

- Fermer les bols et les mettre en place sur les supports :




- dévisser la molette M (le cliquet SB étant en position haute) pour pouvoir placer librement le bol entre les deux sabots (fixe : SF, et mobile : SM)
- mettre en place une extrémité du bol dans le sabot fixe (SF),
- visser la molette M pour caler le bol dans le sabot mobile SM, mais **sans serrer**
- tourner le cliquet SB de 90° pour l'abaisser dans les encoches prévues,
- visser la molette de façon entendre quelques "clics" (8-10 maxi).
- **NE JAMAIS FORCER**

- Abaisser le capot
- Régler éventuellement les paramètres de broyage (cf. manuel) : le seul réglage utile est celui du temps de broyage (Pour le modifier appuyer sur la touche "SET", puis ajuster au temps désiré, enfin sauvegarder en appuyant à nouveau sur la touche "SET").
- Lancer le broyage (pour des échantillons bien secs, 1 à 3 minutes suffisent généralement)
- Récupérer les échantillons avec une spatule ou en retournant le bol sur un papier à pesée,
- Laver les bols (attention : les joints ne peuvent pas être enlevés, il faut les soulever légèrement pour nettoyer dessous avec un petit goupillon), les rincer soigneusement en finissant par une rinçage à l'alcool et les mettre à sécher à l'étuve.
- remplissez le cahier d'utilisation

**Points à respecter absolument :**

- <u>ne jamais utiliser le broyeur avec un seul bol installé, et charger avec des masses voisines</u>
- <u>ne pas utiliser des billes d'un matériau différent de celui du bol</u>.
- **<u>ne jamais serrer fortement le dispositif de serrage</u>** : le système d'encliquetage est largement suffisant pour maintenir les bols.